

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/14885 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/68**

(72) Erfinder; und

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/AT00/00224**

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WOLOSZCZUK, Wolfgang [AT/AT]; Wlassakstr. 26, A-1130 Wien (AT). HAWA, Gerhard [AT/AT]; Untere Kaistrasse 24/6/8, A-1100 Wien (AT).**

(22) Internationales Anmelde datum:  
17. August 2000 (17.08.2000)

(74) Anwalt: **ITZE, Peter; c/o Patentanwälte Casati Wilhelm, Itze Peter, Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).**

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
A 1444/99 20. August 1999 (20.08.1999) AT



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Indikatorpeptid zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen. Antikörperzusammensetzung und Immunoassay

Die Erfindung bezieht sich auf ein Indikatorpeptid zur Diagnose und/oder 5 Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen, auf eine Antikörperzusammensetzung zur Bestimmung von C-Typ natriuretischen Peptiden sowie auf ein Immunoassay-Verfahren für pro CNP(1-80), einen Immunoassay zur Bestimmung von humanem pro CNP(1-80) und ein in vitro-Diagnose- bzw. Prognoseverfahren.

10 Cardiovasculäre Schäden sind häufige klinische Krankheiten, die zu verschiedenen Syndromen beitragen oder, speziell bei älteren Personen, dafür verantwortlich sind, wie z.B. für Arteriosklerose, Nierenversagen u.dgl. Es gibt einige Marker, die in der Lage sind, die Diagnose von solchen Zuständen zu erleichtern. Es ist 15 verständlich, daß einfache Screening-Verfahren, die Risikopersonen identifizieren und eine rasche Diagnose erlauben, hilfreich für ein zeitgerechtes Einschreiten und Verhindern des Fortschreitens der Krankheiten sind. Es ist daher wünschenswert, solche Risikopersonen schon zu identifizieren, bevor sich die Krankheit ausgebildet hat, um so ein zeitgerechtes Einschreiten der Medizin zu ermöglichen.

Derzeit gibt es wenige Methoden, die die Wahrscheinlichkeit von 20 cardiovasculären Erkrankheiten vorherzusagen vermögen. Häufig beobachtete Probleme mit derartigen Verfahren sind die ungenügende Genauigkeit und Empfindlichkeit oder das Erfordernis nach Ausarbeitung von Untersuchungen oder einer teuren Ausrüstung, für die ein speziell trainiertes Personal erforderlich ist. Es besteht daher der Bedarf für ein einfaches Verfahren einer genauen und empfindlichen 25 Methode, die nicht nur diagnostiziert, sondern auch die Wahrscheinlichkeit einer cardiovasculären Erkrankung vorhersagen kann, u.zw. entweder als chronischer Zustand oder als akuter Zustand, wie beispielsweise septische Komplikationen. Personen mit besonderem Risiko vor dem Auftreten größerer Schäden identifizieren, erfassen und behandeln zu können, würde große klinische Bedeutung haben. Derzeit 30 existierende Behandlungen sind teuer und auch alternative Erfindungen sind kostenaufwendig, sodaß es nicht kosteneffektiv ist, jedermann ohne Indikation in der Absicht zu behandeln, das Entstehen einer Krankheit zu verhindern.

C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) ist ein Polypeptid, das ursprünglich aus Schweinehirn durch T. Sudoh und seine Mitarbeiter (Biochem- Biophys.Res. Commun., 168:863-879, 1990) isoliert wurde. Nach Klonieren und Durchführen der Sequenzanalyse der cDNA, die für das Peptid kodiert, wurde gezeigt, daß 5 menschliches CNP im menschlichen Vascularsystem durch Endothelialzellen erzeugt wird (S. Suga et al, J.Clin Invest 1992; 90: 1145 - 9). Es wird angenommen, daß menschliches C-Typ natriuretisches Peptid als ein Precursor, der aus 126 Aminosäuren besteht, produziert wird. Von den ersten 23 Resten wird angenommen, daß sie als Signalpeptid wirken, wobei diese ersten 23 Reste abgeschnitten werden, um proCNP 10 zu erhalten (proCNP oder CNP(1-103)). ProCNP wird vor oder während der Sekretion gespalten, um die biologisch aktive Form von CNP, CNP-22 zu bilden. Eine am N-Terminus verlängerte Form, CNP 53, ist die hauptsächlich im Schweinehirn (Minamino et al, Biochem. Biophys. Res.commun. 1990, 170:973-9) vorkommende molekulare Form von CNP. CNP Immunreakтивität wurde in menschlichen 15 Vascularendothelzellen (Singo et al Am. J.Physiol 199; 263: H1318-21) in Plasma und in Nieren (Mattingly et al. Kidney Int. 1994; 46: 744-7) gefunden. Die Plasmakonzentrationen von proCNP (1-80) und proCNP (1-50), das sind die Peptide, die aus den ersten 80 bzw. 50 Aminosäure, gerechnet vom N-Terminus von proCNP bestehen, sind in Patienten, die an endothelialen Erkrankungen (z.B. Arteriosklerose, 20 Naruka T. et al, Circulation 1996; 94:3103-8) und Nierenversagen (Igaki T. et al, Kidney Int. Suppo.1996, 55: 144-7) leiden, erhöht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Überlegung, daß die N-terminalen Fragmente von menschlichem proCNP (1-103)(SEQ ID NO:1), ähnlich wie proCNP (1-80) und proCNP (1-50), aufgrund ihrer gegenüber CNP-Hormonen (CNP-22 bzw. 25 CNP 53) langen Halbwertszeit als gute diagnostische Indikatoren oder Prognosemittel für alle Fälle von endothelialen Schäden oder renalen Krankheiten, z.B. Risiko für Arteriosklerose, septischen Schock oder chronischer Nierendisfunktion dienen können.

Menschliches proCNP (1-80) (SEQ ID NO:1) und proCNP (1-50) kann daher als Basis entweder für ein Diagnose- oder für einen Prognosetest für die vorgenannten 30 Zustände, und auch in erster Linie für die Biosynthese von Antikörpern, zum Gebrauch in solchen Tests dienen, weiters aber auch als Antigen für einen kompetitiven Bindungsmunoassay. ProCNP(1-80) (SEQ ID NO:1) oder ein immunogenes

Fragment daraus kann vorteilhafterweise an ein immunogenes Protein oder Peptid, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, konjugiert werden.

Demgemäß liegt die Erfindung in der Schaffung eines Indikatorpolypeptids zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen 5 Erkrankungen, wobei das Polypeptid erfindungsgemäß das N-terminale Fragment proCNP (1-80)(SEQ ID NO:1) des C-Typ natriuretischen Prekursors Aminosäure (1-126) Swiss Prot. P23582) ist.

Derartige Polypeptide können zur Erzielung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper eingesetzt werden, die spezifisch auf CNP(1-80) (SEQ ID NO:1) sind.

10 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist es, ein Immunoassay-Verfahren für menschliches CNP(1-80)(SEQ ID NO:1), ein antigenes Fragment davon, oder eine Polypeptidverlängerung davon zur Verfügung zu stellen, wobei der primäre Bindungspartner ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung ist. Immunoassays sind natürlich im Stand der 15 Technik bekannt, wie z.B. RIA, EIA, Fluoreszenzimmunoassay (FIA) oder Trockenchemieteststreifen-Immunoassays. So ein Immunoassay verwendet grundsätzlich einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper gemäß der Erfindung in immobilisierter Form, z.B. an einer Mikrotiterplatte, an Membranen oder Partikel, um die Ziel-Verbindung proCNP(1-80) zu isolieren. In einem Sandwichassay kann das 20 gebundene Antigen mittels eines zusätzlichen löslichen Antikörpers gemäß der Erfindung, der ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein kann, nachgewiesen werden. Dieser Antikörper kann entweder eine Markierung tragen oder, noch einfacher, selbst später durch Reaktion mit einem zweiten Antikörper, der eine 25 Markierung trägt, markiert werden. Wenn dabei also der erste Antikörper gemäß der Erfindung in einem Schaf gezüchtet wurde, kann der zweite Antikörper ein Antischafantikörper sein.

Geeignete Markierungen umfassen Radionuklide, fluoreszierende Substanzen, z.B. Europium basierte Hybridverfahren, Farbstoffe oder gefärbte Partikel, wie z.B. kolloidales Gold. Alternativ kann ein Bindungsassay verwendet werden, bei welchem 30 eine bekannte Menge von markiertem menschlichem proCNP(1-80) (SEQ.ID NO.1) oder ein antigenes Fragment davon einer Analytlösung zugesetzt und mit einer begrenzten Menge von immobilisiertem Antikörper in Kontakt gebracht wird, wodurch

die Menge des markierten Antigens, welches immobilisiert wird, umgekehrt proportional der Menge des im Analyt vorhandenen Zielantigens ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Immunoassay-Kit aus menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1), einem antigenen Fragment davon 5 oder einer Polypeptidverlängerung davon, welche folgendes enthält:

- (a) einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung in immobilisierter Form, und
- (b) eine weitere Komponente ausgewählt aus
  - (bi) , eine markierte Probe von menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) oder 10 ein antigenes Fragment davon,
  - (bii) ein Antikörper in nicht immobilisierter Form, und
  - (biii) ein markierter zweiter Antikörper, der spezifisch für den nicht immobilisierten Antikörper gemäß (bii) ist.

Ein solcher Immunoassay und Testsatz kann dazu verwendet werden, verwandte 15 biologische Systeme zu untersuchen, sowie auch Diagnosen oder Prognosen von Zuständen zu stellen, in welchen der Titer von menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) in Körperflüssigkeiten ein diagnostischer oder präventiver Indikator ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Zuständen, in welchen die Konzentration von 20 menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) oder einem antigenen Fragment oder einer Polypeptidverlängerung davon ein diagnostischer oder prädiktiver Indikator ist, bei dem Körperflüssigkeit eines Patienten in vitro einem Immunoassay unterworfen wird, um die Gegenwart oder Menge von menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) darin aufzufinden oder zu bestimmen.

25 Resultate von unter Dialysebehandlung stehenden Patienten zeigen eindeutig, daß das proCNP-Niveau deutlich bei Patienten erhöht ist, welche an chronischer Nierenfehlfunktion leiden. Dies wird auch noch dadurch gestützt, daß proCNP in sogenannten Hemofiltraten von Dialysepatienten aufgefunden wird (siehe auch Schulz-Knappe et al J.Chromatogr.A776 (1997) 125-132), wie dies in Fig. 3 illustriert 30 ist.

Folgende Konzentrationen wurden gefunden:

CNP3:1,7 pmol/l

CNP1: 12,4 pmol/l Hemofiltrat.

Hemofiltrate wurden deshalb verwendet, weil sie nahezu unbeschränkt vorliegen und überdies die Peptidhormonkonzentrationen jener von menschlichem Plasma sehr ähnlich sind (Schulz-Knappe et al Eur.J.Med. Res.(1995/96) 1:223-236).

5 Demgemäß können die Immunoassays zur Beobachtung von chronischer Nierenfehlfunktion eingesetzt werden.

Obwohl derzeit wenig dokumentiert, kann humanes proCNP (1-80) (SEQ ID NO:1) auch als diagnostisches Werkzeug zur Risikoabwägung für die Entwicklung von Arteriosklerose eingesetzt werden (Naruka T. et al, circulation 1996, 94:3103-8).

10 Die Körperflüssigkeit, an welcher der Immunoassay ausgeführt wird, kann jegliche Körperflüssigkeit sein, in welcher menschliche proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) vorhanden ist; es wird aber üblicherweise Plasma-Serum oder Harn verwendet werden. In einigen Fällen kann es angezeigt sein, die Peptide zu extrahieren oder die Probe vor der Durchführung des Assays anderweitig zu behandeln.

15 Das menschliche proCNP (1-80)(SEQ ID.NO:1) Peptid oder ein Antigen oder immunogenes Fragment davon kann mit in der Wissenschaft gut bekannten Techniken durch Synthese aus den sie bildenden Aminosäuren zusammengestellt oder durch das Zusammensetzen von vorsynthetisierten Aminosäureblöcken gebildet werden. Rekombinante Expression von Peptiden ist natürlich eine andere, sehr passende 20 Methode zur Erzeugung des Antigens für die Immunisierung. Wo markiertes Material notwendig ist, kann die Markierung durch Standardtechniken eingebracht werden.

Zum Zweck der Herstellung von Antikörpern kann das menschliche proCNP(1-80)(SEQ.ID NO:1) oder ein antigenes Fragment davon an ein immunogenes Protein oder Peptide, wie es Stand der Technik ist, konjugiert werden.

25 Die erfindungsgemäßen Antikörper können durch Injizierung von proCNP-Antigen gemäß der Erfindung in ein Wirtstier hergestellt werden, u.zw. vorteilhafterweise durch ein Konjugat mit einem immunogenen Protein wie vorstehend beschrieben. Geeignete Wirtstiere sind z.B. ein Schaf, um entweder ein Serum, welches polyklonale Antikörper enthält, oder z.B. eine Maus oder ein Kaninchen, um 30 Milzzellen für die Umwandlung zu Hybridomas oder immortalisierten Zelllinien zu gewinnen und damit monoklonale Antikörper herzustellen.

Beispiel 1: Produktion von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern gegen CNP(1-80)

Konjugation:

3 synthetisierte Fragmente aus proCNP (1-80)(SEQ ID NO:1): proCNP (1-19), 5 proCNP (29-50) und proCNP (51-79) wurden durch die Fa. Pichem GmbH, in Graz (Österreich) synthetisiert und an ein passendes Trägerprotein konjugiert (z.B. Thyroglobulin).

Immunisierung:

18 Schafe wurden verwendet. Die Schafe erhielten 2 mg des entsprechenden 10 Antigens, das mit nicht ulcerativem Freund'schem Adjuvans (Guildhay, GB) und BCG (bacillus Calmette Guerlin) gemischt ist

Screening:

Mikrotiterplatten wurden mit synthetischen proCNP Peptidsequenzen (1 µg/ml) beschichtet. Probeblut wurde in Phosphatpuffer mit 3%igem BSA 1 : 15 1000/10000/100000 verdünnt, und die Bindung eines Antikörpers wurde durch Zusatz von Antischaf IgG-Peroxidase-Konjugat, gefolgt von Substratzugabe (TMB) nachgewiesen.

Monoklonale Antikörper können analog hergestellt werden, wobei Mäuse oder Kaninchen als Wirtstiere verwendet werden und Hybridomas nach im Stand der 20 Technik bekannten Verfahren hergestellt werden.

Beispiel 2: Immunoassay für proCNP(1-80) (SEQ ID NO:1) oder immunreaktive Fragmente davon.

Die Antikörper können in verschiedenen Arten von Immunoassay für proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) oder immunreaktiven Fragmenten davon verwendet 25 werden. Diese sind u.a.

- (a) Radioimmunoassay (RIA)
- (b) Enzymimmunoassay (EIA)
- (c) Enzymgebundenes Immunosorbentassay (ELISA) einschließlich 30 "sandwich"-Typ Methoden, die auf Mikrotiterplatten oder Membranen ausgeführt werden.
- (d) verschiedene trockenchemische Teststreifenimmunoassays.

Nachfolgend ist ein Beispiel basierend auf einem kompetitiven Enzymimmunassay wiedergegeben. Mikrotiterplatten werden mit Schafantikörpern vorbeschichtet. Dann wird der spezifische proCNP Antikörper zugesetzt und für drei bis fünf Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ dazu können Platten, die mit proCNP vorbeschichtet sind und mit Karion F (Merk, Nr. 2993) stabilisiert sind, verwendet werden.

200 µl der Probe oder des Standards zusammen mit 50 µl eines Tracers (Biotin-markiertes proCNP(1-80) oder ein Fragment davon) wird in die Vertiefungen eingegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen werden 10 gewaschen und mit 200 µl von Streptavidin-Peroxidase von Southern Biotechnology (SB-7100-05) inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt und Zusatz von Substrat (Tetramethylenbenzidin, TMB) bildet sich eine Farbe aus, die umgekehrt proportional zu der proCNP-Konzentration der Probe ist und in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen wird. Ein Beispiel einer Standardkurve für proCNP(1-19) und proCNP 15 (51-79), die mit dieser Art von Assay erhalten wurden, ist in Fig. 2 wiedergegeben.

20

25

30

## Sequenzprotokoll SEQUENZ ID.-Nr. 1

&lt;110&gt; Biomedica GmbH

&lt;120&gt; proCNP Immunoassay

&lt;160&gt; 1

5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro Asn

1 5 10

10 Thr Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro  
15 20Gln Ala Ala Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly  
25 30Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Ala Asn  
35 40Leu Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Asn  
45 5015 Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala  
55 60Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro  
65 70Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys  
75 80

20

25

30

## Patentansprüche:

1. Indikatorpolypeptid zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid, das N-terminale Fragment proCNP (1-80)(SEQ.ID NO:1) des C-Typ-natriuretischen Precursors (1-126 Aminosäuren, Swiss Prot; P23582) oder ein Fragment davon ist.
2. Antikörperzusammensetzung zur Bestimmung von C-Typ natriuretischen Peptiden, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Antikörper enthält, der spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet, welches aus den Aminosäuren 1 - 80 des N-terminus des menschlichen pro C-Typ natriuretischen Peptiden (pro CNP(1 - 80)) (SEQ. ID. No. 1), oder eines Fragmentes davon besteht.
3. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein polyklonaler Antikörper ist.
4. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
5. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper mit einer Markierung versehen ist.
6. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung ein Radionuklid, Biotin, eine fluoreszierende Substanz, ein Enzym, ein Farbstoff oder gefärbte Partikel sind.
7. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper an einem festen Träger immobilisiert ist.
8. Immunoassayverfahren für proCNP(1 - 80), (SEQ. ID. No.1), gekennzeichnet durch folgende Schritte:
  - a) Kontaktieren einer Patientenkörperflüssigkeit mit einem primären Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 6, um einen Komplex aus Antikörper und proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) zu bilden; und
  - b) Messung der Bildung dieses Komplexes.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein an Mikrotiterplatten, Membranen oder Partikeln (Beads) immobilisierter Antikörper eingesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung der Bildung des Komplexes aus Antikörper und proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) dieser Komplex mit einem zweiten Antikörper, der an proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) bindet, in Kontakt gebracht wird, um einen Sekundärkomplex aus 5 beiden Antikörpern und proCNP zu bilden, der dann in Form eines Sandwichassays erfaßt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Antikörper am festen Träger immobilisiert wird und daß eine bekannte Menge von markiertem humanem proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No. 1) oder ein markiertes 10 Antigenfragment davon der in Lösung befindlichen Körperflüssigkeit zugesetzt wird, um einen kompetitiven Bindungsassay zu erzielen.

12. Immunoassay zur Bestimmung von humanem CNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1), welcher folgendes enthält:

a) einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in 15 immobilisierter Form und

b) wenigstens eine weitere Zusammensetzung aus folgender Gruppe:

- b i) eine markierte Probe von menschlichem proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) oder ein antigenes Fragment davon.
- b ii). ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie
- 20 b iii) ein markierter zweiter Antikörper, der speziell an einem Antikörper nach einem der Ansprüche 1 und 3 bindet.

13. In vitro-Diagnose- bzw. -Prognoseverfahren für Krankheiten, die zu einer erhöhten Bildung von proCNP führen, bei welchem eine Körperflüssigkeit eines Patienten mit einem ersten Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 4 in Kontakt 25 gebracht wird, um einen Komplex aus erstem Antikörper und proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No. 1) zu bilden, und die Bildung des genannten Komplexes gemessen wird, um die Konzentration von proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No.1) in der Körperflüssigkeit zu bestimmen, wobei eine erhöhte Konzentration von proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No.1) im Vergleich zur Konzentration bei normalen Personen zur Diagnose von 30 cardiovasculären und endothelialen Erkrankungen genutzt wird.

1 / 2

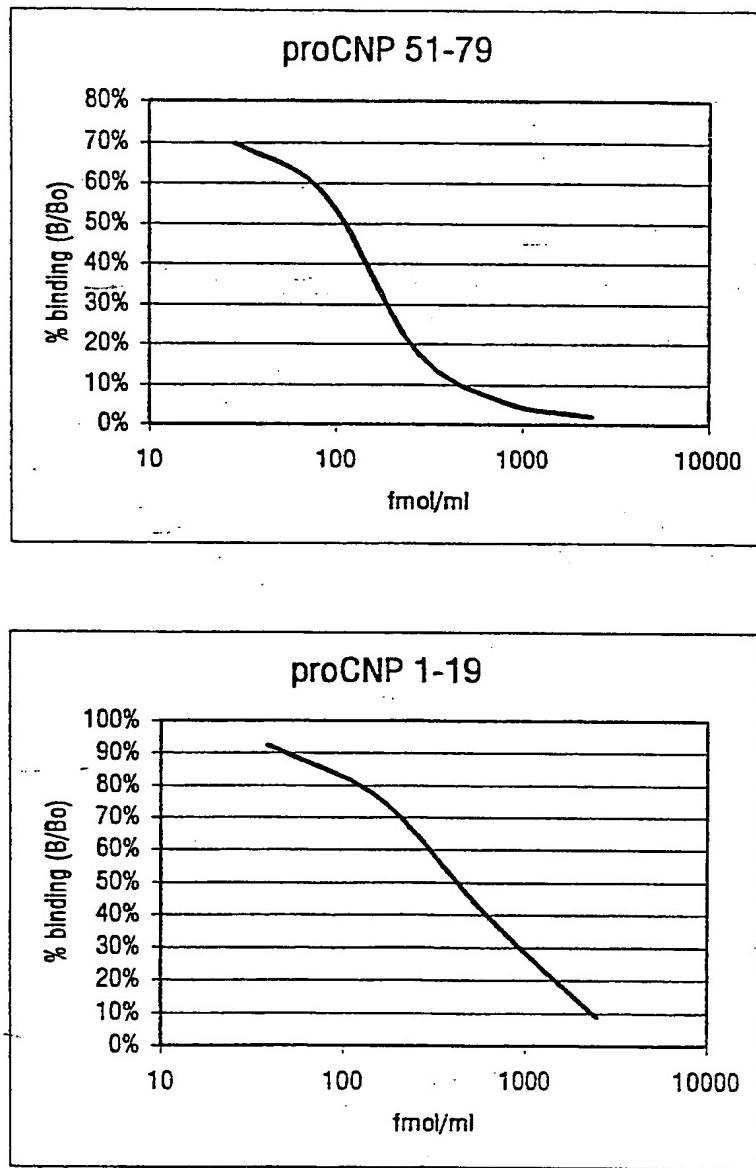


Figure 1

2/2

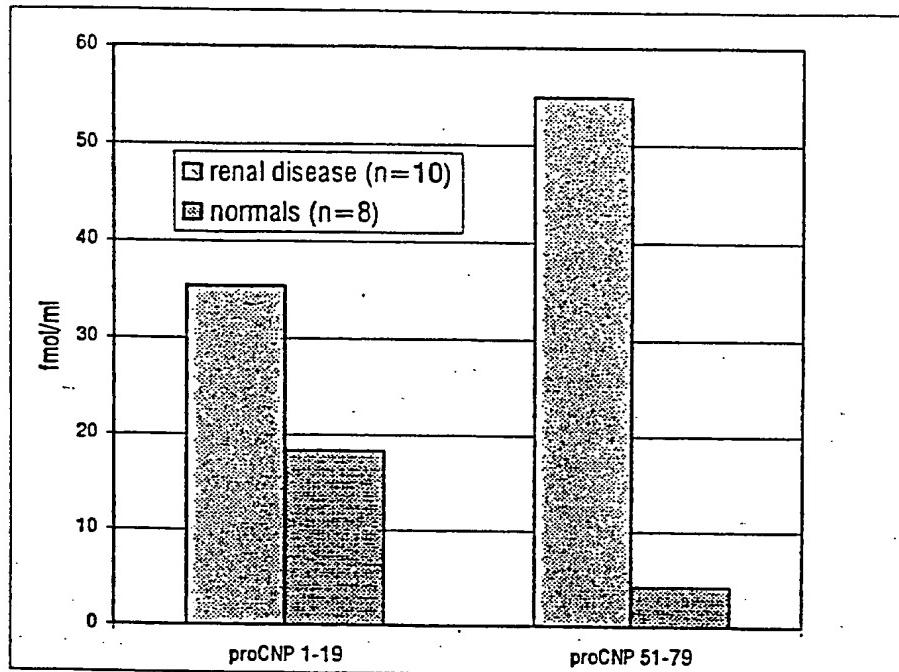


Figure 2

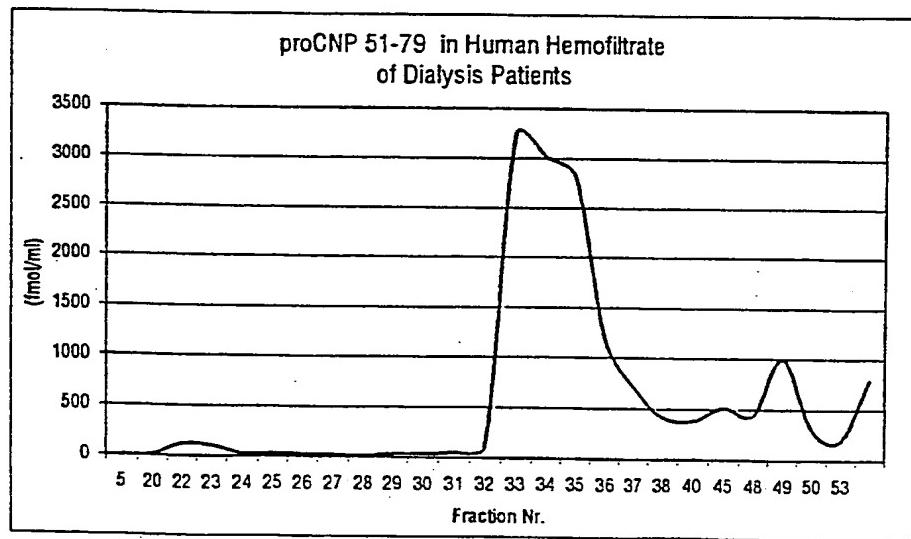


Figure 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40  
 K P G A P P K V P R T P P A E E L A E P Q A A G G G Q K K G D K A P G G G G A N  
 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66-67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80  
 L K G D R S R L L R D L R V D T K S R A A W A R L L Q E H P N A R K Y K G A N K

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

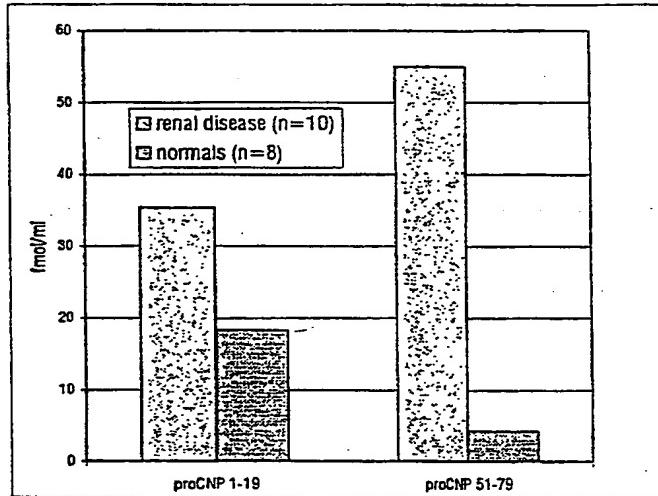
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/14885 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/58**, G01N 33/74
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WOLOSZCZUK, Wolfgang [AT/AT]; Wlassakstr. 26, A-1130 Wien (AT). HAWA, Gerhard [AT/AT]; Untere Kaistrasse 24/6/8, A-1100 Wien (AT).**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/AT00/00224**
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
17. August 2000 (17.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
A 1444/99 20. August 1999 (20.08.1999) AT
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BIOMEDICA GESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Divischgasse 4, A-1210 Wien (AT).**
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: INDICATOR PEPTIDE FOR DIAGNOSING AND/OR PREDICTING CARDIOVASCULAR AND/OR ENDOTHELIAL DISEASES, ANTIBODY COMPOSITION AND IMMUNOASSAY

(54) Bezeichnung: INDIKATORPEPTID ZUR DIAGNOSE UND/ODER VORHERSAGE VON CARDIOVASCULÄREN UND/ODER ENDOTHELIALEN ERKRANKUNGEN, ANTIKÖRPERZUSAMMENSETZUNG UND IMMUNOASSAY



**WO 01/14885 A3**

(57) Abstract: An invention relates to an indicator polypeptide for diagnosing and/or predicting cardiovascular and/or endothelial diseases. Said peptide is the N-terminal fragment proCNP (1-80)(SEQ.ID NO:1) of the C-type natriuretic precursor (1-126 amino acids, Swiss Prot; P23582).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Indikatorpolypeptid zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen, wobei das Peptid, das N-terminale Fragment proCNP (1-80)(SEQ.ID NO:1) des C-Typ-natriuretischen Precursors (1-26 Aminosäuren, Swiss Prot; P23582) ist.



europeisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:

14. Februar 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 00/00224

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C07K14/58 G01N33/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; NARUKO T ET AL: "C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions." retrieved from STN Database accession no. 97143105 XP002170387 &amp; CIRCULATION, (1996 DEC 15) 94 (12) 3103-8.,  cited in the application abstract</p> <p>----- -/-</p>	2-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2001

Date of mailing of the international search report

23/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT 00/00224

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; ITOH H ET AL: "Antagonism between the vascular renin-angiotensin and natriuretic peptide systems in vascular remodelling." retrieved from STN Database accession no. 95195858 XP002170388 &amp; BLOOD PRESSURE. SUPPLEMENT, (1994) 5 49-53. ,  abstract</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KOMATSU, YASATO ET AL: "Regulation of secretion and clearance of C - type natriuretic peptide in the interaction of vascular endothelial cells and smooth muscle cells" retrieved from STN Database accession no. 125:77446 CA XP002170389 &amp; J. HYPERTENS. (1996), 14(5), 585-592 , 1996, abstract</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; IGAKI T ET AL: "C-type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans." retrieved from STN Database accession no. 96336640 XP002170390 abstract &amp; KIDNEY INTERNATIONAL. SUPPLEMENT, (1996 JUN) 55 S144-7. ,</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	2-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 00/00224

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KOMATSU, YASATO ET AL: "Regulation of endothelial production of C - type natriuretic peptide in coculture with vascular smooth muscle cells: role of the vascular natriuretic peptide system in vascular growth inhibition" retrieved from STN Database accession no. 124:221719 CA XP002170391 & CIRC. RES. (1996), 78(4), 606-14 , 1996, abstract ---	2-12
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HAMA, N. ET AL: "A monoclonal antibody to C - type natriuretic peptide - preparation and application to radioimmunoassay and neutralization experiment" retrieved from STN Database accession no. 121:55562 CA XP002170392 & J. ENDOCRINOL. (1994), 141(3), 473-9 , 1994, abstract ---	2-12
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MATTINGLY, MICHAEL T. ET AL: "Presence of C - type natriuretic peptide in human kidney and urine" retrieved from STN Database accession no. 121:272917 CA XP002170393 abstract & KIDNEY INT. (1994), 46(3), 744-7 , 1994, ---	2-12
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; NICHOLLS, M. G. ET AL: "Review: natriuretic peptides" retrieved from STN Database accession no. 126:84738 CA XP002170394 & J. INT. FED. CLIN. CHEM. (1996), 8(4), 159-160 , 1996, abstract ---	2-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00224

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07K14/58 G01N33/74

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; NARUKO T ET AL: "C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions." retrieved from STN Database accession no. 97143105 XP002170387 &amp; CIRCULATION, (1996 DEC 15) 94 (12) 3103-8.,</p> <p>in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p> <p>----- -/-</p>	2-12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10. Oktober 2001	23/10/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Masturzo, P

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00224

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; ITOH H ET AL: "Antagonism between the vascular renin-angiotensin and natriuretic peptide systems in vascular remodelling." retrieved from STN Database accession no. 95195858 XP002170388 &amp; BLOOD PRESSURE. SUPPLEMENT, (1994) 5 49-53. ,  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KOMATSU, YASATO ET AL: "Regulation of secretion and clearance of C - type natriuretic peptide in the interaction of vascular endothelial cells and smooth muscle cells" retrieved from STN Database accession no. 125:77446 CA XP002170389 &amp; J. HYPERTENS. (1996), 14(5), 585-592 , 1996, Zusammenfassung</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; IGAKI T ET AL: "C-type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans." retrieved from STN Database accession no. 96336640 XP002170390 Zusammenfassung &amp; KIDNEY INTERNATIONAL. SUPPLEMENT, (1996 JUN) 55 S144-7. ,  ---</p> <p>-/-</p>	2-12

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00224

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KOMATSU, YASATO ET AL: "Regulation of endothelial production of C - type natriuretic peptide in coculture with vascular smooth muscle cells: role of the vascular natriuretic peptide system in vascular growth inhibition" retrieved from STN Database accession no. 124:221719 CA XP002170391 &amp; CIRC. RES. (1996), 78(4), 606-14 , 1996, Zusammenfassung</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HAMA, N. ET AL: "A monoclonal antibody to C - type natriuretic peptide - preparation and application to radioimmunoassay and neutralization experiment" retrieved from STN Database accession no. 121:55562 CA XP002170392 &amp; J. ENDOCRINOL. (1994), 141(3), 473-9 , 1994, Zusammenfassung</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MATTINGLY, MICHAEL T. ET AL: "Presence of C - type natriuretic peptide in human kidney and urine" retrieved from STN Database accession no. 121:272917 CA XP002170393 Zusammenfassung &amp; KIDNEY INT. (1994), 46(3), 744-7 , 1994,</p> <p>---</p>	2-12
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; NICHOLLS, M. G. ET AL: "Review: natriuretic peptides" retrieved from STN Database accession no. 126:84738 CA XP002170394 &amp; J. INT. FED. CLIN. CHEM. (1996), 8(4), 159-160 , 1996, Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	2-12

**Free Online Translator**

Translate words just by mousing over them.  
Download Google Toolbar.  
toolbar.google.com

**Webster Dictionary**

Browse a huge selection now. Find exactly what you want today.  
[www.ebay.com](http://www.ebay.com)

**Gaelic Ringtone**

Send this complimentary ringtone to phone right now!  
[RingRingMobile.com](http://RingRingMobile.com)

[Ads by Google](#)[Advertise](#)

- [Home](#)
- [Word of the Week](#)
- [Links for Word Lovers](#)
- [Crossword Solver](#)
- [Help](#)
- [Bookstore](#)
- [Advertise](#)
- [Copyrights](#)
- [Privacy](#)
- [Contact Us](#)

Visit [allmath.com](http://allmath.com) -  
site for Math  
Students  
Travel Deals  
Vegas Hotels  
Hotel Rooms  
[Poker Player Dating](#)  
Online Biographies



# Allwords.com

*Find It! First, Fast and Free!*

English Dictionary - With Multi-Lingual Search

Your Query of 'appreciably' Resulted in 1 Matches  
From The AND Dictionary

Displaying Items 1 through 1

**Definitions**

**appreciable**  
*adj*

1. Noticeable; significant; able to be measured or noticed.  
Example: The new motorway makes an appreciable difference to the travelling time  
Thesaurus: definite, discernible, evident, noticeable, obvious, substantial, undeniable, perceptible, measurable, considerable, apparent, clear-cut, pronounced; Antonym: negligible.

**Derivative:** appreciably  
*adverb*

**Etymology:** Early 19c: from appreciate.

Content Under License from Crystal Reference, copyright 2003.

**Find:**

- Words Starting With:
- Words Ending With:
- Words Containing:
- Words That Match:

**Search Language:** English ▾

**Translate Into:**

Dutch  French  German